



石斑鱼虹彩病毒病发生风险评估模型的建立和验证

刘泽天, 张馨, 黄晓红, 黄友华, 秦启伟*

(华南农业大学海洋学院, 海洋生物资源保护与利用粤港澳高校联合实验室,
广东省水产免疫与健康养殖工程技术研究中心, 广东广州 510642)

摘要: 为评估石斑鱼养殖过程虹彩病毒病发生的风险, 实验结合 Delphi 法和层次分析法 (analytic hierarchy process, AHP) 构建新加坡石斑鱼虹彩病毒 (SGIV) 发生的风险评估模型。风险因素评估指标体系包括 1 个目标层 (石斑鱼虹彩病毒病发生风险), 5 个准则层 (水质、石斑鱼健康状况、饲养管理、养殖模式和养殖环境) 和 20 个指标层风险因素 (水温、pH、溶解氧、氨氮、病毒感染、细菌感染等)。准则层风险因素权重值集合为 $W=\{0.129\ 8, 0.367\ 2, 0.173\ 3, 0.032\ 7, 0.297\ 1\}$, 指标层风险因素中病毒感染 (0.248\ 5)、邻近区域发病情况 (0.138\ 4)、水温 (0.112\ 3) 和养殖密度 (0.105\ 0) 等权重值较高, 推测它们是影响石斑鱼虹彩病毒病暴发的高风险因素。进一步实验室模拟感染实验结果表明, 养殖密度、病毒感染剂量及养殖温度均显著影响鱼体内新加坡石斑鱼虹彩病毒 (SGIV) 的复制及实验鱼死亡率。上述结论和评估模型中推定的高风险因素相吻合, 说明该模型可用于石斑鱼养殖过程中虹彩病毒病发生的风评估。

关键词: 石斑鱼; 虹彩病毒病; 风险评估模型; Delphi 法; 层次分析法

中图分类号: S 941.41

文献标志码: A

石斑鱼 (*Epinephelus* spp.) 是我国南方沿海及东南亚各国最名贵的海水养殖鱼类之一, 经济价值极高。目前, 我国石斑鱼养殖年产量超过 18 万 t, 占全世界石斑鱼养殖总量的 60% 以上。然而, 随着养殖规模的扩大及抗生物素药物的滥用, 病害频发严重制约石斑鱼养殖业的健康可持续发展。近年来, 暴发和流行的虹彩病毒 (iridovirus) 是石斑鱼最严重的传染性病原之一, 已经在世界范围内蔓延并造成巨大的经济损失^[1-2]。新加坡石斑鱼虹彩病毒 (Singapore grouper iridovirus, SGIV) 分离于养殖的患病石斑鱼, 被鉴定为高致病性虹彩病毒, 是虹彩病毒科 (*Iridoviridae*) 蛙病毒属 (*Ranavirus*) 的一种新病毒^[3]。石斑鱼感染 SGIV 后表现出鱼体发黑, 游泳能力减弱, 甚至昏睡等症

状, 故石斑鱼虹彩病毒病也称为石斑鱼昏睡病 (sleepy grouper disease, SGD)^[4-5]。SGIV 感染力强, 主要感染仔鱼和幼鱼, 在 1 周内可使石斑鱼死亡率达 90% 以上。在华南海区, 养殖石斑鱼全年处于 SGIV 感染的风险中。迄今为止, 对于石斑鱼虹彩病毒病还缺乏有效的防控措施。

越来越多的数据显示, 动物疫病风险评估作为疫病风险分析过程中的关键和核心, 在疾病的早期预警、预防及制定有效防控措施中发挥着关键作用^[6]。风险评估是指在对过去信息资料分析的基础上, 运用逻辑推理或概率论及数理统计等方法, 对已识别的某一个或某几个特定风险事件发生的概率以及风险事件发生后所造成损失的严重程度做出定性、半定量或定量分析, 从而预测

收稿日期: 2021-01-24 修回日期: 2021-06-13

资助项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1404504, 2018YFC0311302); 国家现代农业产业技术体系专项 (CARS-47-G16)

第一作者: 刘泽天 (照片), 从事水生动物病害与免疫相关研究, E-mail: 805161724@qq.com

通信作者: 秦启伟, 从事鱼类免疫学及海洋分子病毒学研究, E-mail: qinqw@scsio.ac.cn



出较准确并满足一定规律性结果的过程^[7]。20世纪90年代, 欧盟、美国和日本等国家开展动物卫生风险分析工作, 在畜牧兽医与食品安全领域取得良好的效果。近年来, 国内学者在陆生动物疾病和肉类食品安全等方面开展了大量风险分析工作, 如高致病性禽流感^[8]、猪瘟^[9]、口蹄疫^[10]等。与陆生动物疾病相比, 我国水生动物卫生风险评估研究起步较晚。在21世纪初期, 国外学者已经将风险分析方法运用到水生动物疾病风险评估中, 如传染性鲑贫血症 (infectious salmon anaemia, ISA)、病毒性出血性败血症 (viral hemorrhagic septicemia, VHS)、传染性脾肾坏死病毒病 (infection spleen and kidney necrosis virus, ISKNV)、流行性溃疡综合征 (epizootic ulcerative syndrome, EUS)、鲟虹彩病毒病和鲟疱疹病毒病^[11-15]等。近几年, 国内的学者也利用层次分析法建立了十多种水生动物疾病发生和传入的定量或定性风险评估模型, 包括草鱼出血病、鲤春病毒血症、牡蛎弧菌病、金鱼造血器官坏死病、罗非鱼湖病毒病^[16-20]等。在水生脊椎动物虹彩病毒病发生的风评估研究中, 孙华蓉等^[21]对黑龙江省海林地区东北林蛙虹彩病毒病的发生建立了风险评估模型。陈智光等^[22]对笋壳鱼暴发传染性脾肾坏死病毒病进行了风险评估。尽管国内学者对石斑鱼苗场虹彩病毒病传染性病原传入途径构建了风险评估指标体系^[23], 但目前尚未见石斑鱼养殖阶段虹彩病毒病发生的风评估的报道。本研究综合考虑水质、健康状况、饲养管理、养殖模式和养殖环境等多种因素, 对石斑鱼养殖过程中SGIV引起的昏睡病进行分析, 以期找到影响石斑鱼虹彩病毒病发生的主要风险因素, 基于Delphi法和层次分析法建立石斑鱼虹彩病毒病发生风险评估模型, 对于石斑鱼虹彩病毒病发生的防控起到早期预警作用。

1 材料与方法

1.1 风险因素确定

确定风险因素的方式: ①通过查阅石斑鱼养殖、石斑鱼虹彩病毒病等相关文献资料, 找出导致石斑鱼虹彩病毒病发生的相关风险因子。②根据近几年本课题组对我国南方石斑鱼主要养殖区开展石斑鱼虹彩病毒病的流行病学调查, 分析石斑鱼养殖过程虹彩病毒病发生的相关风险因子。③咨询国内外石斑鱼研究者、水产病害专家、鱼病兽医师、养殖户和一线技术人员, 并结合他们的经验, 总结归纳出疾病发生的风险因子, 最后

筛选出石斑鱼养殖过程中导致石斑鱼虹彩病毒病发生的相关风险因素。

1.2 基于层次分析法建立风险评估模型

风险指标体系构建 层次分析法是一种针对多目标的风险分析工具, 能将复杂的问题进行系统条理化和清晰化的分析^[24]。石斑鱼虹彩病毒病的发生受多种因素的影响, 包括宿主、环境、养殖模式及管理技术等, 利用层次法将上述确定的相关风险因素进行归类, 构建石斑鱼虹彩病毒病的风险指标体系。此风险评估指标体系由目标层、准则层和指标层组成, 初步确定石斑鱼虹彩病毒病发生(A)的风险因素包括准则层5项(B1~B5)、指标层20项(C1~C20)(图1)。

风险因子权重确定 在筛选出新加坡石斑鱼虹彩病毒病发生相关风险因素的基础上, 利用Delphi法对相关风险指标建立判断矩阵。Delphi法, 又称专家意见法或专家规定程序调查法, 是由调查者整理问卷调查内容, 挑选同行专家以匿名发表意见的方式反馈调查内容。整理反馈意见后, 再根据不同意见进行问卷调查。以此反复地调查、反馈、再调查的流程, 直到专家们的意见趋于集中^[25]。本研究向国内40位从事石斑鱼养殖的一线养殖户和职业渔医, 以及从事相关研究的科研人员 and 病防专家进行问卷调查, 对准则层B中的B1水质、B2健康状况、B3饲养管理、B4养殖模式和B5养殖环境相对于目标层A石斑鱼虹彩病毒病发生的重要性两两比较, 采用Saaty^[26]提出的1~9标度法, 对准则层B相对于目标层的重要性进行打分, 1表示同等重要, 3表示稍微重要, 5表示比较重要, 7表示重要, 9表示极重要, 通过判断矩阵求解风险因子权重。

一致性检验 求解判断矩阵的最大特征根 λ_{max} , 判断矩阵A的不一致程度通过 $\lambda_{max}-N$ 来表示(N 为矩阵阶数)。利用 $CI = (\lambda_{max} - N) / (N - 1)$ 计算出一致性指标(当 $CI < 0.1$ 时, 一般认为矩阵的一致性通过检验)。但在建立判断矩阵的过程中, 除了思维判断的不一致影响判断矩阵一致性的原因外, 判断矩阵本身的构成也是引起判断矩阵偏离一致性的原因。从而据公式 $CR = CI / RI$ (RI 为平均一致性指标^[24])求得一致性比率。

1.3 实验室模拟关键风险因子验证模型

实验动物和病毒 3月龄的珍珠龙胆石斑鱼 [*E. lanceolatus* (♂) × *E. fuscoguttatus* (♀)], 体长

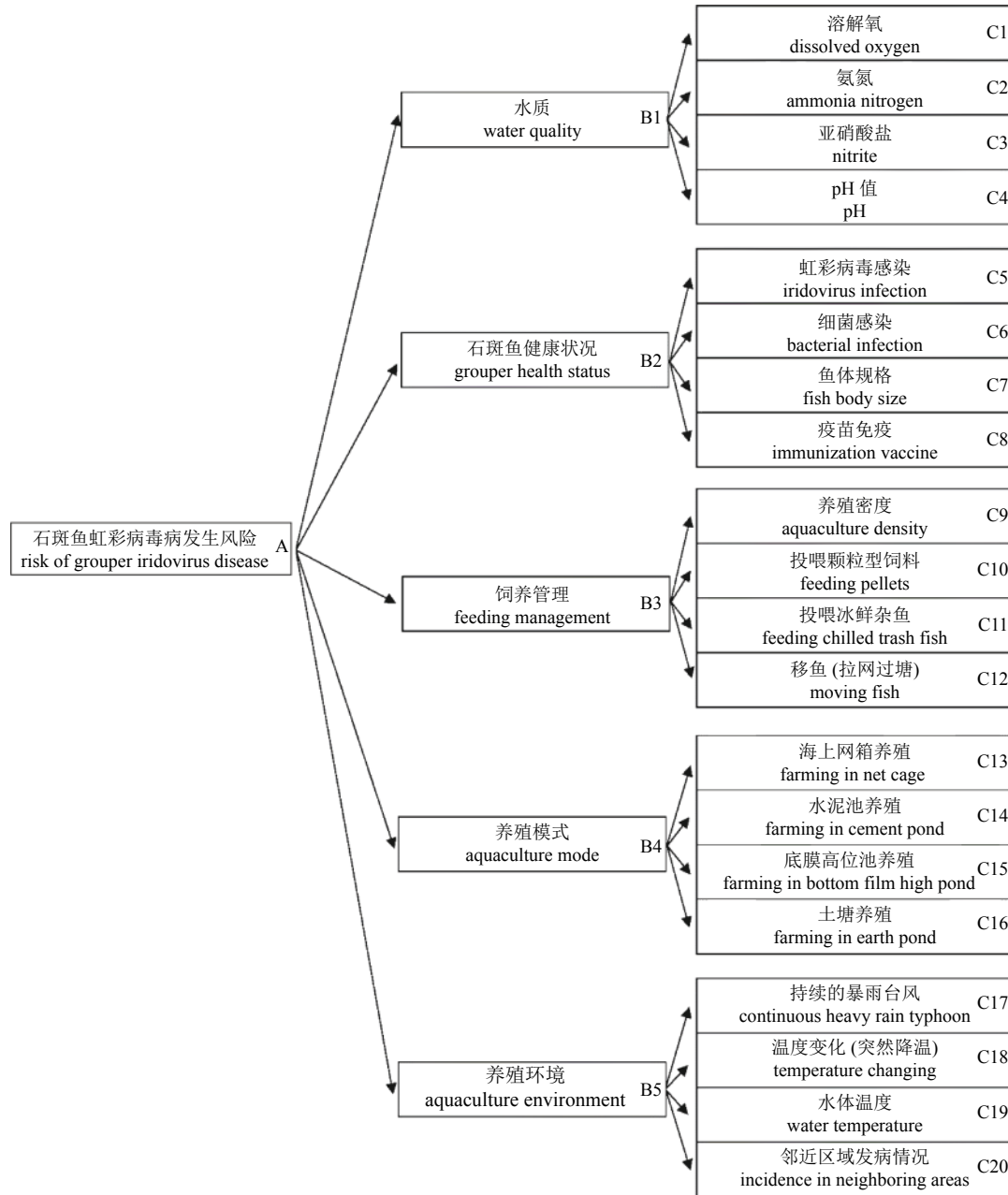


图 1 石斑鱼虹彩病毒病发生风险指标体系

Fig. 1 Risk index system of grouper iridovirus disease occurrence

7~10 cm, 体质量 15~25 g, 购自广东省茂名市金阳生物有限公司。感染实验前随机抽样检测鱼体自然携带 SGIV 病毒情况, 检测结果显示, 抽取的鱼体中均不携带 SGIV。

感染实验中接种病毒为实验室保存的 SGIV, 病毒滴度为 1.0×10^6 TCID₅₀/mL。感染鱼体实验表明, 该病毒的半致死剂量为 1.5×10^5 TCID₅₀。

设定实验室模拟的关键风险因子 为了确定石斑鱼虹彩病毒病发生的关键风险因子, 在实验室分别设定不同温度、病毒接种量以及养殖

密度的模拟养殖条件, 通过检测鱼体内病毒基因转录水平及病毒感染致死率来评价这些关键风险因素对疾病发生的影响。根据石斑鱼虹彩病毒病流行特征、石斑鱼养殖及病毒感染的半致死浓度, 确定温度为 28 °C、密度为 15~17 kg/m³和半致死剂量 1.5×10^5 TCID₅₀ 是石斑鱼虹彩病毒病发病的标准条件。以此为基准, 设定实验组温度条件: 24 °C (低温)、28 °C (适温) 和 32 °C (高温), 密度均为 15~17 kg/m³, 接种病毒量均为 1.5×10^5 TCID₅₀; 养殖密度条件: 11~13 kg/m³ (低密度)、15~17 kg/m³

(适宜密度)和 $>20\text{ kg/m}^3$ (高密度), 温度均为 $28\text{ }^\circ\text{C}$, 接种病毒量均为 $1.5\times 10^5\text{ TCID}_{50}$; 接种病毒量条件: $1.0\times 10^5\text{ TCID}_{50}$ (低剂量)、 $1.5\times 10^5\text{ TCID}_{50}$ (半致死剂量) 和 $2.0\times 10^5\text{ TCID}_{50}$ (高剂量), 温度均为 $28\text{ }^\circ\text{C}$, 密度均为 $15\sim 17\text{ kg/m}^3$ 。在温度为 $28\text{ }^\circ\text{C}$, 密度为 $15\sim 17\text{ kg/m}^3$ 的条件下注射同体积磷酸盐缓冲液 (PBS) 感染鱼体作为无感染对照组。病毒感染后连续观察 7 d, 每日统计死亡鱼数量。并分别在第 3 天、第 5 天和第 7 天检测鱼体组织中病毒基因的转录水平。

荧光定量 PCR (qPCR) 分别在鱼体感染病毒后的第 3 天、第 5 天和第 7 天使用 RNA 提取试剂盒 (SV Total RNA Isolation System, Promega) 提取肾脏和脾脏组织 RNA, 应用 ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (TOYOBO) 试剂盒逆转录 RNA 获得 cDNA 模板。通过 qPCR 检测感染鱼体组织中的病毒囊膜蛋白基因 VP19 和主要衣壳蛋白基因 MCP 的转录水平。检测所用引物和 qPCR 反应体系参考实验室前期发表的文章^[27]。qPCR 反应在 Applied Biosystems Quant Studio 5 荧光定量 PCR 仪 (Thermo, 美国) 上完成。

数据分析 数据用平均值±标准差表示。数据分析使用 SPSS 20 软件进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 进行差异显著性分析, $P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 风险指标体系及权重

利用层次分析法构建了石斑鱼养殖过程中虹彩病毒病发生的风险指标体系, 该指标体系包括 5 个准则层 (B1~B5) 和 20 个风险指标层 (C1~C20)。通过对准则层构建判断矩阵, 采用 Saaty^[26] 提出的 1~9 标度法, 根据专家的打分结果, 将准则层各因素进行两两比较, 计算出各风险指标的相对权重和绝对权重。石斑鱼虹彩病毒病发生风险 A 的判断矩阵结果显示, 5 个准则层风险因素权重值集合为 $W=\{0.129\ 8, 0.367\ 2, 0.173\ 3, 0.032\ 7, 0.297\ 1\}$, 其中, B2 权重最高, B4 权重最低 (表 1), 说明准则层中石斑鱼健康状况是石斑鱼感染虹彩病毒病最重要的影响因子。此外 $CR=0.059\ 5<0.1$, 说明判断矩阵具有满意的一致性, 权重分配合理。

表 1 石斑鱼虹彩病毒病发生风险 A 的判断矩阵

Tab. 1 Judgment matrix for grouper iridovirus disease risk A

石斑鱼虹彩病毒病发生风险 A risk of grouper iridovirus disease A	B1	B2	B3	B4	B5	权重 W
B1 水质 water quality	1	1/3	1/2	7	1/3	0.129 8
B2 石斑鱼健康状况 grouper health status	3	1	2	8	2	0.367 2
B3 饲养管理 feeding management	2	1/2	1	6	1/2	0.173 3
B4 养殖模式 aquaculture mode	1/7	1/8	1/6	1	1/7	0.032 7
B5 养殖环境 aquaculture environment	3	1/2	2	7	1	0.297 1

注: 一致性检验得出, $\lambda_{max}=5.266\ 8$, $CI=0.066\ 7$, $RI=1.12$ (已知), $CR=0.059\ 5<0.1$, 通过验证
Notes: consistency check shows that $\lambda_{max}=5.266\ 8$, $CI=0.066\ 7$, $RI=1.12$ (known), $CR=0.059\ 5<0.1$, passed verification

同理分别构建水质风险 B1、健康状况风险 B2、饲养管理风险 B3、养殖模式风险 B4 和养殖环境风险 B5 间的指标判断矩阵。数据表明, 在水质 B1 的判断矩阵中, 溶解氧 C1 权重最高 0.624 0, 氨氮 C2 权重最低 0.094 6 (表 2)。在健康状况 B2 的判断矩阵中, 是否携带虹彩病毒 C5 的权重最高 0.676 8, 是否免疫疫苗 C8 的权重最低 0.083 4 (表 3)。在饲养管理 B3 的判断矩阵中, 养殖密度 C9 的权重最高 0.606 0, 是否投喂冰鲜杂鱼 C11 的权重最低 0.077 2 (表 4)。在养殖模式 B4 的判断矩阵中, 底膜高位池养殖 C15 的权重最高 0.557 1, 水泥池养殖 C14 的权重最低 0.058 2 (表 5)。在养

殖环境状况 B5 的判断矩阵中, 邻近区域发病情况 C20 的权重最高 0.466 0, 温度变化 (突然降温) C18 的相对权重最低 0.063 8 (表 6), 且表 1~6 一致性检验均通过验证。

将表 1~6 得到的结果进行层次总排序, 计算每一个指标层对最高层的相对重要性排序, 即总排序 (表 7)。层次总排序后, 一致性检验得出, $CR=0.065\ 2<0.1$, 故总排序一致性检验通过。结果表明, 指标层风险因素中病毒感染 (0.248 5)、养殖密度 (0.105 0)、水温 (0.112 3) 和邻近区域发病 (0.138 4) 4 个指标权重值较高, 推定它们是影响石斑鱼虹彩病毒病发病的高风险因素。

表 2 养殖水质风险 B1 的判断矩阵

Tab. 2 Judgment matrix for breeding water quality risk B1

B1 水质 water quality	C1	C2	C3	C4	权重 <i>W</i>
C1 溶解氧 dissolved oxygen	1	5	7	5	0.624 0
C2 氨氮 ammonia nitrogen	1/5	1	1/3	1	0.094 6
C3 亚硝酸盐 nitrite	1/7	3	1	2	0.182 0
C4 pH值 pH	1/5	1	1/2	1	0.099 3

注: 一致性检验得出, $\lambda_{max}=4.217 9$, $CI=0.072 6$, $RI=0.89$ (已知), $CR=0.081 6<0.1$, 通过验证

Notes: consistency check shows that $\lambda_{max}=4.217 9$, $CI=0.072 6$, $RI=0.89$ (known), $CR=0.081 6<0.1$, passed verification

表 3 石斑鱼健康状况风险 B2 的判断矩阵

Tab. 3 Judgment matrix of grouper health risk B2

B2 健康状况 health status	C5	C6	C7	C8	权重 <i>W</i>
C5 虹彩病毒感染 iridovirus infection	1	9	7	5	0.676 8
C6 细菌感染 bacterial infection	1/9	1	1	2	0.117 2
C7 鱼体规格 fish body size	1/7	1	1	2	0.122 6
C8 疫苗免疫 immunization vaccine	1/5	1/2	1/2	1	0.083 4

注: 一致性检验得出, $\lambda_{max}=4.179 8$, $CI=0.059 9$, $RI=0.89$ (已知), $CR=0.067 4<0.1$, 通过验证

Notes: consistency check shows that $\lambda_{max}=4.179 8$, $CI=0.059 9$, $RI=0.89$ (known), $CR=0.067 4<0.1$, passed verification

表 4 养殖饲养管理风险 B3 的判断矩阵

Tab. 4 Judgment matrix of breeding management risk B3

B3 饲养管理 feeding management	C9	C10	C11	C12	权重 <i>W</i>
C9 养殖密度 aquaculture density	1	7	7	3	0.606 0
C10 投喂颗粒型饲料 feeding pellets	1/7	1	1	1/2	0.090 3
C11 投喂冰鲜杂鱼 feeding chilled trash fish	1/7	1	1	1/4	0.077 2
C12 移鱼(拉网过塘) moving fish	1/3	2	4	1	0.226 5

注: 一致性检验得出, $\lambda_{max}=4.050 2$, $CI=0.016 7$, $RI=0.89$ (已知), $CR=0.018 8<0.1$, 通过验证

Notes: consistency check shows that $\lambda_{max}=4.050 2$, $CI=0.016 7$, $RI=0.89$ (known), $CR=0.018 8<0.1$, passed verification

表 5 养殖模式风险 B4 的判断矩阵

Tab. 5 Judgment matrix of breeding model risk B4

B4 养殖模式 aquaculture mode	C13	C14	C15	C16	权重 <i>W</i>
C13 海上网箱养殖 farming in net cage	1	4	1/4	1	0.186 3
C14 水泥池养殖 farming in cement pond	1/4	1	1/7	1/4	0.058 2
C15 底膜高位池养殖 farming in bottom film high pond	4	7	1	3	0.557 1
C16 土塘养殖 farming in earth pond	1	4	1/3	1	0.198 4

注: 一致性检验得出, $\lambda_{max}=4.067 0$, $CI=0.022 3$, $RI=0.89$ (已知), $CR=0.025 1<0.1$, 通过验证

Notes: consistency check shows that $\lambda_{max}=4.067 0$, $CI=0.022 3$, $RI=0.89$ (known), $CR=0.025 1<0.1$, passed verification

表 6 养殖环境状况风险 B5 的判断矩阵

Tab. 6 Judgment matrix of breeding environment risk B5

B5 养殖环境 aquaculture environment	C17	C18	C19	C20	权重 <i>W</i>
C17 持续的暴雨台风 continuous heavy rain typhoon	1	2	1/7	1/5	0.092 2
C18 温度变化(突然降温) temperature changing	1/2	1	1/6	1/5	0.063 8
C19 水体温度 water temperature	7	6	1	1/2	0.378 0
C20 邻近区域发病情况 incidence in neighboring areas	5	5	2	1	0.466 0

注: 一致性检验得出, $\lambda_{max}=4.166 3$, $CI=0.055 4$, $RI=0.89$ (已知), $CR=0.062 3<0.1$, 通过验证

Notes: consistency check shows that $\lambda_{max}=4.166 3$, $CI=0.055 4$, $RI=0.89$ (known), $CR=0.062 3<0.1$, passed verification

表 7 指标层总排序

Tab. 7 Total ranking of indicator layer

	B1	B2	B3	B4	B5	权重 <i>W</i>
	0.1298	0.3672	0.1733	0.0327	0.2971	
C1	0.6240					0.0810
C2	0.0946					0.0123
C3	0.1820					0.0236
C4	0.0993					0.0129
C5		0.6768				0.2485
C6		0.1172				0.0430
C7		0.1226				0.0450
C8		0.0834				0.0306
C9			0.6060			0.1050
C10			0.0903			0.0157
C11			0.0772			0.0134
C12			0.2265			0.0393
C13				0.1863		0.0061
C14				0.0582		0.0019
C15				0.5571		0.0182
C16				0.1984		0.0065
C17					0.0922	0.0274
C18					0.0638	0.0189
C19					0.3780	0.1123
C20					0.4660	0.1384

2.2 关键风险因子验证

为了验证评估模型的准确性，分别在实验室模拟不同温度、病毒接种量以及养殖密度，通过鱼体内病毒基因转录水平及病毒感染致死率来验证这些关键风险因素对疾病发生的影响。研究表明，与感染低剂量病毒组相比，感染高剂量组中鱼体死亡率增加，第 7 天时约达 60%，而低剂量组死亡率只有 38%。在适宜温度 28 °C 感染

半致死剂量的实验组，鱼体在第 7 天时死亡率约 48%，而高温 32 °C 或低温 24 °C 感染组，鱼体的死亡率明显降低，分别约为 10% 和 25%。在不同养殖密度条件下感染半致死剂量病毒的实验组，鱼体的死亡率与密度呈正比，高密度养殖感染组，鱼体在第 7 天时死亡率约 62% (图 2)。同时，利用 qPCR 技术检测实验组鱼体中病毒基因的转录水平。结果表明，鱼体组织中病毒基因的转录水平与养殖密度和接种病毒剂量呈正比。温度对感染鱼体中病毒基因的转录水平也有一定影响，与适宜温度实验组相比，温度的升高或降低均下调鱼体中病毒基因的转录水平 (图 3)。以上结果一致说明，养殖密度、接种病毒指数及养殖温度均显著影响鱼体内病毒的载量及鱼体的死亡率。这一结果与前期构建的模型中推定的高风险因素相吻合，说明该模型可用于对石斑鱼养殖过程中虹彩病毒病发生风险的评估。

3 讨论

本研究结合石斑鱼虹彩病毒病流行特征，利用层次分析法和 Delphi 法初步构建了石斑鱼虹彩病毒病发生的风险评估模型，确定影响该病发生的主要风险因素。进一步在实验室模拟养殖过程，验证该模型。

风险评估指标体系的构建是风险评估的第一步也是最重要的一步，因为风险指标的选择直接关系到风险评估结果是否直观、实用、有效^[28]。对于多变量风险问题，数据资料非常有限，利用专家的知识 and 经验进行风险评估是国内外常用的一种方法^[29-30]。国内多篇有关动物疫病风险评估模型报道，约一半采用 Delphi 法^[31]。本研究中利用有关石斑鱼虹彩病毒病的流行特征，结合国内专家或养殖一线人员提供的数据，通过 Delphi 法

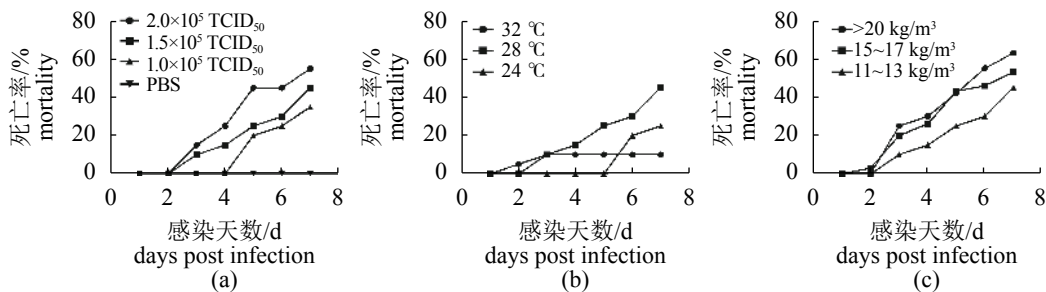


图 2 实验室不同病毒感染剂量 (a)、温度 (b) 和养殖密度 (c) 条件下感染鱼的累计死亡率

Fig. 2 Cumulative mortality of infected fish under different virus infection dose (a), temperatures (b) and breeding density (c) conditions in the laboratory

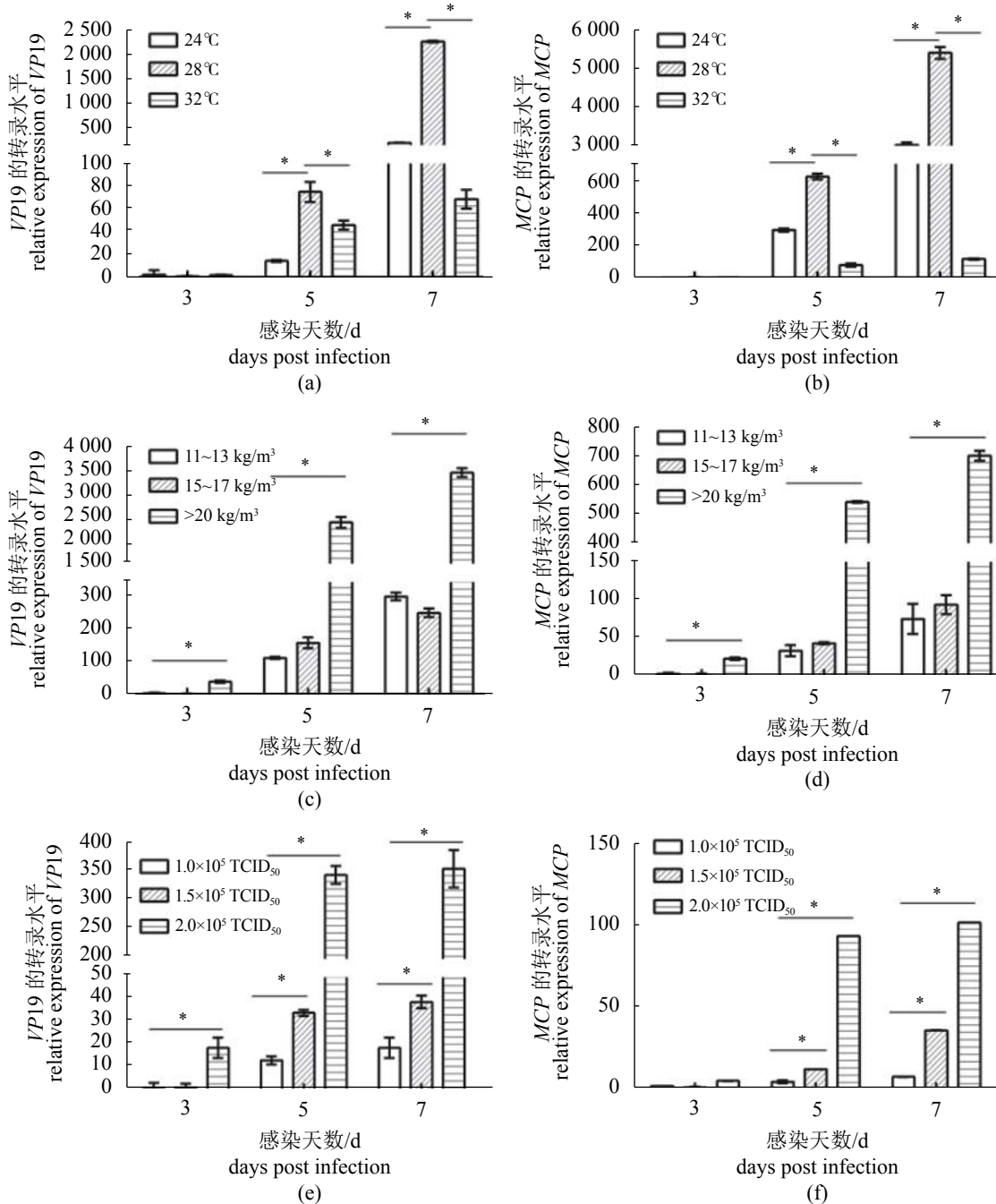


图3 实验室不同养殖条件下感染鱼体中病毒基因的转录表达

(a)(b) 不同养殖温度下, VP19 和 MCP 的表达情况; (c)(d) 不同养殖密度下, VP19 和 MCP 的表达情况; (e)(f) 不同感染剂量下, VP19 和 MCP 的表达情况, * P<0.05

Fig. 3 Transcription and expression of viral genes in infected fish under different culture conditions in the laboratory

Relative expression of VP19 and MCP at different temperature (a)(b), density (c)(d) and virus dose (e)(f), * P<0.05

和层次分析法相结合构建了石斑鱼虹彩病毒病发生的风险评估模型。评估指标体系包括水质、健康状况、饲养管理、养殖模式和养殖环境 5 个准则层和 20 指标风险层。5 个准则层风险因素权重值集合为 $W=\{0.1298, 0.3672, 0.1733, 0.0327, 0.2971\}$, 指标层风险因素中病毒感染、养殖密度、

水温 and 邻近区域发病 4 个指标权重值较高, 预估它们是影响石斑鱼虹彩病毒病发病的高风险因素。在草鱼出血病发生风险半定量评估研究中, 评估指标体系包含 9 个目标层和 26 个风险指标层, 其中免疫和鱼种权重值最高, 放养密度和水温权重值次之。鱼体健康程度、放养密度和水温是影响

草鱼出血病发生风险的关键因素^[16]。在石斑鱼虹彩病毒病发生的指标体系中尽管也包含疫苗免疫,但是与草鱼出血病疫苗相比,SGIV的灭活疫苗目前还没有商品化,不能大范围推广使用,故在专家打分中分值较低,也直接影响疫苗免疫指标体系的权重。在对牡蛎养殖过程中副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)感染的风险评估模型中,包括3个准则层和13个风险指标层,其中,指标层分析因素中水温、盐度和养殖密度为影响副溶血性弧菌感染的主要风险因子^[18]。从以上水生动物疾病风险评估的研究中推测,水温和养殖密度在疾病的发生过程中为普遍高风险因子。

动物疾病的发生与多种环境因素有关,作为变温动物鱼类,水温变化对于鱼类生长和疾病发生密切相关。已经有多种证据表明,温度过高或过低均影响病毒的增殖,从而影响疾病的发生。如水温影响不同基因型 β 诺达病毒(β -Nodavirus)对舌齿鲈(*Dicentrarchus labrax*)的致病性,赤点石斑鱼神经坏死症病毒(red-spotted grouper nervous necrosis virus, RGNNV)毒株对幼年舌齿鲈幼鱼的致病性最强,但其临床发病率和死亡率仅在较高温度下出现。条纹鲈神经坏死病毒(striped jack nervous necrosis virus, SJNNV)对舌齿鲈的致病性较弱,仅在20℃时在幸存鱼体的大脑中检测到病毒复制^[32]。本研究表明,温度过高或过低均下调SGIV感染导致的致死率及鱼体内病毒基因的转录水平,这与SGIV流行病学调查结果一致,25~28℃为SGIV昏睡病主要暴发温度。此外,水体中养殖密度影响鱼体对溶解氧的要求和鱼体免疫力。本研究中构建的石斑鱼虹彩病毒病的风险评估模型显示,健康状况、养殖环境和饲养管理是权重值最高的3个准则层,即为发生风险概率最高的3个因素,这也从侧面说明石斑鱼虹彩病毒病发生是宿主、病原和环境三者共同作用的结果。在B2准则层中病毒感染权重最大,由于目前SGIV疫苗还在研发过程中,尚没有商品化的疫苗可用于该病的预防,因此疫苗免疫权重最低。相反,在草鱼出血病风险评估模型中,鱼种免疫的权重较高,凸显免疫工作的重要性。故在石斑鱼虹彩病毒病的防控中,疫苗研制应是该病有效防控的重要手段。另一方面,在石斑鱼虹彩病毒病防控中,应加强苗种检验检疫工作,确保养殖鱼体健康无携带病毒,有效降低后期疾病发生的机率。

为了验证模型预测的石斑鱼虹彩病毒病发生

关键风险因子,在实验室模拟不同温度、病毒接种量以及养殖密度这3个高风险养殖条件,以期评价这些关键风险因素对疾病发生的影响。实验室数据和风险评估的结果高度一致,说明该模型可用于石斑鱼养殖过程中虹彩病毒病发生的风险评估。

综上所述,本研究建立了一个方便可行的石斑鱼虹彩病毒病风险评估模型,石斑鱼养殖业者可利用此模型进行风险评估,及时了解石斑鱼在养殖过程中的健康状况,找出阻断病原传入的关键控制点,提高石斑鱼虹彩病毒病防控水平,保障石斑鱼养殖业健康可持续发展。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Whittington R J, Becker J A, Dennis M M. Iridovirus infections in finfish - critical review with emphasis on ranaviruses[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2010, 33(2): 95-122.
 - [2] Jancovich J K, Michel B, Touchman J W, et al. Evidence for multiple recent host species shifts among the ranaviruses (family Iridoviridae)[J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(6): 2636-2647.
 - [3] Chinchar V G, Hick P, Ince I A, et al. ICTV virus taxonomy profile: Iridoviridae[J]. *Journal of General Virology*, 2017, 98(5): 1159-1160.
 - [4] Qin Q W, Chang S F, Ngoh-Lim G H, et al. Characterization of a novel ranavirus isolated from grouper *Epinephelus tauvina*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2003, 53(1): 1-9.
 - [5] Qin Q W, Lam T J, Sin Y M, et al. Electron microscopic observations of a marine fish iridovirus isolated from brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina*[J]. *Journal of Virological Methods*, 2001, 98(1): 17-24.
 - [6] 梁鹏达. 动物疫病监测在动物疫病预防控制中的作用[J]. *畜牧兽医科学*, 2019(19): 143-144.
 - [7] 闫俊平, 魏伟, 陈溥言, 等. 动物卫生风险评估方法研究[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2009(2): 57-59.
 - [8] 吴春艳, 王靖飞, 赵丽丹, 等. 中国高致病性禽流感免疫预防风险评估[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(6): 621-624.
- Wu C Y, Wang J F, Zhao L D, et al. Risk assessment of immune prevention for highly pathogenic avian influenza

- enza in China[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2006, 37(6): 621-624 (in Chinese).
- [9] 王新, 冯鹏, 田庆雷, 等. 依据层次分析理论的非洲猪瘟疫情潜在流行风险评估模型的构建[J]. *动物医学进展*, 2020, 41(12): 13-17.
- Wang X, Feng P, Tian Q L, *et al.* Fuzzy analytical hierarchy process based potential-risk assessment model for African swine fever[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2020, 41(12): 13-17 (in Chinese).
- [10] 周新虎, 剡根强, 王静梅. 口蹄疫发生风险评估模型的建立[J]. *中国兽医杂志*, 2012, 48(1): 84-86.
- Zhou X H, Yan G Q, Wang J M. Establishment of risk assessment model for foot-and-mouth disease[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2012, 48(1): 84-86 (in Chinese).
- [11] McClure C A, Hammell K L, Dohoo I R. Risk factors for outbreaks of infectious salmon anemia in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2005, 72(3-4): 263-280.
- [12] Murray A G, Peeler E J. A framework for understanding the potential for emerging diseases in aquaculture[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2005, 67(2-3): 223-235.
- [13] Jeong J B, Kim H Y, Jun L J, *et al.* Outbreaks and risks of infectious spleen and kidney necrosis virus disease in freshwater ornamental fishes[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2008, 78(3): 209-215.
- [14] El-Matbouli M, Saleh M, Soliman H. Biosecurity risks associated with epizootic ulcerative syndrome and iridovirus in ornamental fish imported into the European Union[J]. *Veterinary Record*, 2014, 174(12): 303.
- [15] Georgiadis M P, Hedrick R P, Johnson W O, *et al.* Risk factors for outbreaks of disease attributable to white sturgeon iridovirus and white sturgeon herpesvirus-2 at a commercial sturgeon farm[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 2000, 61(10): 1232-1240.
- [16] 杨淞, 吴淑勤, 李宁求, 等. 草鱼出血病发生风险半定量评估模型的构建[J]. *中国水产科学*, 2012, 19(3): 521-527.
- Yang S, Wu S Q, Li N Q, *et al.* A semi-quantitative risk assessment model for the outbreak of grass carp hemorrhage[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(3): 521-527 (in Chinese).
- [17] 王姝, 徐立蒲, 王静波, 等. 鲤春病毒血症风险分析[J]. *北京农业*, 2012(18): 107-110.
- Wang S, Xu L P, Wang J B, *et al.* Risk analysis on spring viraemia of carp[J]. *Beijing Agriculture*, 2012(18): 107-110 (in Chinese).
- [18] 林强, 李宁求, 付小哲, 等. 基于层次分析法的牡蛎养殖过程中副溶血弧菌风险评估模型建立和初步应用[J]. *海洋湖沼通报*, 2017(2): 116-122.
- Lin Q, Li N Q, Fu X Z, *et al.* Establishment and application of risk assessment model of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster culture course through analytic hierarchy processing[J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2017(2): 116-122 (in Chinese).
- [19] 任彤, 汪琳, 尹羿, 等. 金鱼造血器官坏死病传入风险评估[J]. *中国动物检疫*, 2020, 37(11): 28-30,48.
- Ren T, Wang L, Yin Y, *et al.* Entry risk assessment for goldfish haematopoietic necrosis virus[J]. *China Animal Health Inspection*, 2020, 37(11): 28-30,48 (in Chinese).
- [20] 郑晓聪, 黄倩君, 朱崧琪, 等. 罗非鱼湖病病毒传入风险分析[J]. *中国动物检疫*, 2020, 37(10): 27-31.
- Zheng X C, Huang Q J, Zhu S Q, *et al.* Entry risk analysis on tilapia lake virus disease[J]. *China Animal Health Inspection*, 2020, 37(10): 27-31 (in Chinese).
- [21] 孙华蓉, 于德江, 王晓龙. 黑龙江省海林地区东北林蛙虹彩病毒发生风险评估[J]. *经济动物学报*, 2011, 15(1): 47-52.
- Sun H R, Yu D J, Wang X L. Risk assessment for the occurrence of iridovirus in *Rana dybowskii* in Hailin, Heilongjiang province[J]. *Journal of Economic Animal*, 2011, 15(1): 47-52 (in Chinese).
- [22] 陈智光, 麦耀宝, 李本旺, 等. 笋壳鱼暴发传染性脾肾坏死病毒病的风险评估[J]. *海洋与渔业*, 2018(7): 66-67.
- Chen Z G, Mai Y B, Li B W, *et al.* Risk assessment of outbreak of infectious spleen and kidney necrosis virus in bamboo fish[J]. *Ocean and Fishery*, 2018(7): 66-67 (in Chinese).
- [23] 马红玲, 徐力文, 程长洪, 等. 石斑鱼育苗场传染性病原(病毒)传入途径风险评估指标体系的构建[J]. *中国动物检疫*, 2019, 36(5): 19-28,48.
- Ma H L, Xu L W, Cheng C H, *et al.* Establishment of risk assessment indicator system for invasion pathways of infectious pathogens (viruses) in grouper farms[J]. *China Animal Health Inspection*, 2019, 36(5): 19-28,48 (in Chinese).
- [24] 许树柏. 层次分析法原理 [M]. 天津: 天津大学出版社, 1986: 15-28.
- Xu S B. Principles of analytic hierarchy process[M]. Tianjin: Tianjin University Press, 1986: 15-28 (in Chinese).
- [25] 孙振球, 徐勇勇. 医学统计学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 387.
- Sun Z Q, Xu Y Y. Medical statistics[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 387 (in Chinese).
- [26] Saaty T L. A scaling method for priorities in hierarchical structures[J]. *Journal of Mathematical Psychology*, 1977, 15(3): 234-281.
- [27] Zhang Y, Wang L Q, Huang X H, *et al.* Fish cholesterol 25-hydroxylase inhibits virus replication via regulating interferon immune response or affecting virus entry[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 322.
- [28] 严斯刚, 韦正吉. 猪重大疫病风险评估体系和评估方法[J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(6): 247-252.

- Yan S G, Wei Z J. Risk assessment system and methods for pig major infectious diseases[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2011, 38(6): 247-252 (in Chinese).
- [29] Oidtmann B C, Peeler E J, Thrush M A, *et al.* Expert consultation on risk factors for introduction of infectious pathogens into fish farms[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2014, 115(3-4): 238-254.
- [30] 李鹏, 王栋, 孙晓东, 等. 我国屠宰场动物疫病风险评估指标体系的构建[J]. *畜牧与兽医*, 2017, 49(9): 132-139.
- Li P, Wang D, Sun X D, *et al.* Establishment of a risk assessment index system for animal diseases in slaughterhouses in China[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 49(9): 132-139 (in Chinese).
- [31] 李鹏, 刘志伟, 王栋, 等. 基于案例的国内动物疫病风险评估技术发展现状研究[J]. *中国动物检疫*, 2018, 35(1): 55-60.
- Li P, Liu Z W, Wang D, *et al.* Development status of animal disease risk assessment technology based on domestic cases studies[J]. *China Animal Health Inspection*, 2018, 35(1): 55-60 (in Chinese).
- [32] Toffan A, Panzarin V, Toson M, *et al.* Water temperature affects pathogenicity of different betanodavirus genotypes in experimentally challenged *Dicentrarchus labrax*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 119(3): 231-238.

Mechanism of oligochitosan improving non-specific immunity of *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *E. lanceolatu* (♂)

LIU Zetian, ZHANG Xin, HUANG Xiaohong, HUANG Youhua, QIN Qiwei*

(College of Marine Sciences, South China Agricultural University, University Joint Laboratory of Guangdong Province, Hong Kong and Macao Region on Marine Bioresource Conservation and Exploitation, Guangdong Aquatic Animal Immunity and Health Aquaculture Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Singapore grouper iridovirus (SGIV), one of the most important viral pathogens in grouper, has caused great economic losses to grouper industry. To evaluate the risk of iridovirus disease in grouper aquaculture, a risk assessment model of grouper iridovirus disease was established using Delphi method and Analytic Hierarchy Process (AHP) in this study. The evaluation index system consisted of 1 target level (risk of grouper iridovirus disease), 5 criterion layers (including water quality, grouper health status, feeding management, aquaculture mode and aquaculture environment), and 20 risk factors at the index level (including water temperature, pH, dissolved oxygen, ammonia nitrogen, iridovirus infection, bacterial infection, etc.). The weight values of 5 criterion-level risk factors was $W = \{0.1298, 0.3672, 0.1733, 0.0327, 0.2971\}$. The higher weight values of risk factors, including virus infection(0.2485), incidence in neighboring areas(0.1384), water temperature(0.1123) and aquaculture density(0.1050), respectively, suggested that these factors might be crucial for the incidence of grouper iridovirus disease in aquaculture. Consistently, the infection experiments in laboratory confirmed that virus dose, density, and temperature all significantly affected the virus replication and the mortality of the fish. Thus, it was proposed that our risk assessment model could be used to assess the risk of iridovirus disease in grouper aquaculture.

Key words: *Epinephelus* sp.; iridovirus disease; risk assessment model; Delphi method; analytic hierarchy process

Corresponding author: QIN Qiwei. E-mail: qinqw@scsio.ac.cn

Funding projects: National Key R & D Program of China (2017YFC1404504, 2018YFC0311302); China Agriculture Research System for Marine Fish Culture Industry (CARS-47-G16)